

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 614 899

(21) N° d'enregistrement national :

87 06513

(51) Int Cl⁴ : C 12 M 3/00, 1/12.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 7 mai 1987.

(71) Demandeur(s) : RANOUX Claude Jean Elie. — FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : Claude Jean Elie Ranoux.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 45 du 10 novembre 1988.

(73) Titulaire(s) :

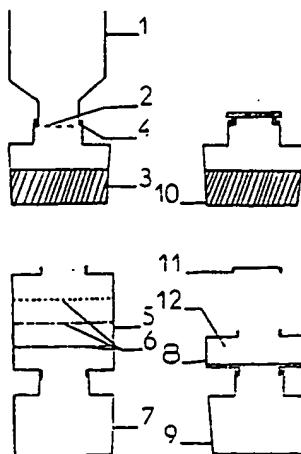
(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Bonnet-Thirion et G. Foldés.

(54) Dispositif pour préparation sélection et capacitation des spermatozoïdes humains et animaux par filtration.

(57) Cette invention concerne un dispositif de filtration pour sélectionner et capaciter les spermatozoïdes en vue d'une fécondation in vitro ou d'une insémination. Ce dispositif comprend un réceptacle 1 pour prélever le sperme qui présente un fond percé de trous 2 et auquel vient s'adapter une ampoule 3 de milieu de culture conditionnée stérilement par l'intermédiaire d'un système de fixation 4. Le système de filtration comporte plusieurs filtres ou membranes filtrantes 6 qui peuvent se répartir en unités de filtration 5 8. Le résultat de cette filtration est recueilli dans des conteneurs 7 9. Une ou plusieurs ampoules de milieu de culture 10 serviront à laver les spermatozoïdes par passage à travers le dernier filtre qui a pour rôle de retenir les spermatozoïdes et qui présente une chambre 12 dans laquelle du B2 pourra être déposé, un bouchon 11 venant obturer l'orifice inférieur du filtre. C'est une fraction de ces spermatozoïdes ainsi préparés qui seront utilisés pour la fécondation ou l'insémination.

1 2 614 899 A1



Le terme de C.I.V.E.T.E. correspond aux abréviations de Culture Intra Vaginale Et Transfert Embryonnaire.

Depuis la mise au point de cette technique en novembre 1985 (Brevet FR 85/16 558; PCT-FR 86/00378) et de ses dérivées, qui 5 correspondent à une très importante simplification de la technique de fécondation in vitro classique, nous n'avons cessé de rechercher une préparation plus facile des spermatozoïdes.

La préparation classique est le plus souvent réalisée par "swimming up". Cette technique, comme la majorité de celles 10 utilisées actuellement, correspond à débarrasser les spermatozoïdes du liquide séminal dans lequel ils se situent et qui interdit toute capacitation. Ainsi le sperme recueilli après éjaculation est dilué dans une solution de Earle, ou autre solution saline à une concentration variant de 20 à 30%. Après 15 dilution et homogénéisation, les tubes contenant le sperme dilué sont centrifugés à 2400-2500 tours / minute pendant 10 à 15 minutes, soit 600 à 700 g. Après ce délai, le surnageant est extrait et les culots de spermatozoïdes sont regroupés et résolubilisés dans 5 cc de Earle environ. Une 2ème centrifugation 20 est alors pratiquée, dans les mêmes conditions; le surnageant est à nouveau enlevé et l'on verse au dessus du culot ainsi obtenu 1 cm³ environ de B2 de Menezo, milieu utilisé pour la fécondation. Le tube est laissé à température ambiante ou placé dans l'étuve à 37° afin que la migration des spermatozoïdes les plus mobiles 25 s'effectue dans le surnageant de B2. Une température à 37° accélère le phénomène de capacitation et la migration de spermatozoïdes. Dans la majorité des spermes préparés, une concentration satisfaisante de 5 à 50 M. de spermatozoïdes présentant une mobilité progressive supérieure à 80% est observée.

Cependant cette technique demeure longue et nécessite une centrifugeuse. Lors des présentations de la C.I.U., un reproche nous a souvent été fait de, certes simplifier la technique de fécondation, mais de toujours avoir à faire cette préparation du 5 sperme.

Dans le désir de simplifier au maximum toute l'étape biologique de la F.I.U. (Fécondation in vitro) et de supprimer tout le matériel 10 fourni, nous avons mis au point une nouvelle technique de préparation des spermatozoïdes à l'aide de filtres. Ce mode de 15 préparation peut aussi être utilisé dans tous les gestes thérapeutiques nécessitant des spermatozoïdes lavés et capacités, de façon stérile, telle l'insémination intra-utérine, intra-tubaire, intra-vaginale, intra-péritonéale ou autre.

La sélection naturelle des meilleurs spermatozoïdes s'effectue, 20 chez la femme, par l'intermédiaire de la glaire dont les études en microscopie électronique ont révélé qu'elle était constituée de grosses mailles comme celles d'un filet de pêche. Les mailles s'élargissant en période ovulatoire afin de laisser passer les spermatozoïdes. En nous basant sur ces observations, nous nous 25 sommes dit qu'il serait peut-être possible de reproduire ce système de filet en remplaçant les mailles par les pores de filtres permettant ainsi de sélectionner les spermatozoïdes. Un système de billes de verre, ou d'une colonne de fibres de verre a déjà été utilisé mais il s'avère être peu efficace, complexe et 30 coûteux. Il peut même nuire, dans le cas des fibres de verre, à l'intégrité de la structure des spermatozoïdes.

Notre méthode, elle, repose sur un système de filtration 35 comprenant plusieurs filtres dont la dimension des pores est

variable, permettant ainsi de retenir les différents éléments étrangers au spermatozoïdes.

Nous allons vous décrire le dispositif que nous envisageons (Fig.I). Le réceptacle (1), pour le recueil du sperme, qui a la forme de celui classiquement utilisé, présente la particularité d'avoir un fond percé de trous (2) dont le diamètre se situe entre 500 um et 1 mm ou plus, il s'agit d'une sorte de pré-filtre. Ainsi après l'éjaculation, et durant la liquéfaction, une première filtration s'effectuera au fond du réceptacle. Les éléments 10 tadioca, de taille variable (1 mm et plus), que l'on rencontre assez fréquemment dans le sperme et qui correspondent à des concrétions protéiques seront retenus au niveau de ce tamis. Ces concrétions qui gênent la préparation classique du sperme se retrouvent dans le culot après centrifugations et interfèrent sur 15 la migration des spermatozoïdes dans le surnageant.

Cette filtration s'effectue de façon passive dès la liquéfaction du sperme. L'éjaculat va se déverser (à travers le fond percé de trous, 2) directement dans une ampoule, cartouche ou flacon (3) à moitié remplie de solution de Earle, ou tout autre milieu de 20 culture dans lequel il se diluera, plusieurs milieux de culture ont été testés sans variations notables du pourcentage de spermatozoïdes capacités (Earle, Thyrode, Ham's F.10, B2 ect...). Cette ampoule ou flacon (3) peut être présentée fermée et conditionnée de façon stérile, afin de conserver intact les 25 qualités du milieu, d'un volume de plus de 20 ml, avec 10 ml de milieu de culture, les 10 ml restant seront en partie comblés dès l'éjaculation par le volume du sperme. Après ouverture de l'ampoule, et avant le prélèvement, un système de pas de vis ou d'embout conique (4) permet de l'adaptation du fond du réceptacle

à l'ampoule. Cette ampoule devra présenter une base assez large afin de pouvoir servir de support au réceptacle.

Dans le cas d'un sperme très visqueux, filant, un rinçage par un supplément de Earle pourra être nécessaire. Le diluat de sperme va 5 être secondairement filtré par un système qui comporte une ou plusieurs unités de filtration fixées impérativement ou en fonction des besoins. La première unité (5) peut être constituée de plusieurs filtres, plaques filtrantes ou membranes (6) dont le diamètre des pores, variables d'un filtre à l'autre pourra aller 10 de façon décroissante de 200 à 30 um, afin d'arrêter la plus grande fraction des cellules et débris protéiques. Une large surface de filtration est nécessaire ainsi, si plusieurs pores sont obstrués par des débris cellulaires, ceci n'interdit pas la filtration du reste du liquide. La structure de ces filtres (6) 15 doit être suffisamment résistante pour qu'un lavage puisse s'effectuer en sens inverse par l'injection d'un liquide sous pression à l'autre extrémité du filtre, afin de le déboucher. Des cellules de plus en plus petites sont retenues au cours de leurs passages à travers les plaques de filtration. Le nombre des 20 filtres et le diamètre des pores restent à déterminer. Ce type de filtre n'a pu être testé puisqu'il n'en existe aucun qui présente des pores de diamètre supérieur à 7 um, en emballage individuel stérile. Ces filtres à larges pores, lorsqu'ils existent, présentent des chelateurs pour retenir certaines poussières ou 25 substances, ou correspondent à des cartouches dont les volumes de filtration sont très nettement supérieurs à ceux que nous envisageons. Cette filtration s'effectue de façon passive. L'ampoule (3) est détachée du réceptacle puis fixée par l'intermédiaire du pas de vis ou de l'embout conique (4) à l'unité

de filtration. L'autre extrémité de l'unité présentant un conteneur (?) vide là aussi vissé ou fixé à l'unité dans lequel viendra se déverser le produit de la filtration. Il suffit de retourner l'unité de filtration, l'ampoule (3) est en haut, là 5 conteneur (?) en bas pour que la filtration s'effectue, la base du conteneur (?) devant être assez large ou pouvant se glisser dans un support afin d'assurer une stabilité à l'ensemble. Le conteneur (?) ainsi rempli est détaché de la première unité (5) et vissé ou fixé sur la deuxième unité de filtration (8) dont les pores sont 10 plus petits. Le diamètre pouvant aller de 20 um à moins de 1 um. Un autre conteneur (?) fixé à l'autre extrémité viendra recueillir là encore le produit de filtration qui, cette fois-ci, ne contiendra pas les spermatozoïdes. Ceux-ci auront été retenus au niveau du dernier filtre dont les pores inférieurs à la dimension 15 d'un spermatozoïde en interdisent le passage. Cette unité de filtration (8) devra posséder des éléments de filtration assez résistants, le passage du liquide se faisant dans les deux sens. Un rinçage des spermatozoïdes s'effectue en remplaçant le conteneur (?) possédant le résidu de filtration par une deuxième 20 ampoule ou flacon (10) remplie de Earle. En retournant l'unité de filtration, le contenu de l'ampoule (10) se déversera, entraînant les spermatozoïdes dans le conteneur (7). Après agitation, afin d'homogénéiser et laver les spermatozoïdes l'unité filtrante est 25 à nouveau retournée. Le conteneur (7) se vide alors et le milieu de culture correspondant à ce rinçage se retrouve dans la cartouche (10). Les spermatozoïdes étant à nouveau retenus en regard du dernier filtre. Il suffit alors de placer un bouchon (11) à la place de la cartouche (9) et d'ouvrir l'unité filtrante au-dessus du dernier filtre sur lequel repose les spermatozoïdes

et de verser un peu de B2 de Manezo dans la chambre supérieure (12) pour obtenir un diluat de spermatozoïdes lavés, prêts à la fécondation. Les spermatozoïdes les plus mobiles pourront être prélevés soit immédiatement, soit après migration d'1/2 heure à 5 37°, dans la partie supérieure de la chambre (12), à l'aide d'une pipette ou d'une aiguille. La chambre pourra elle-même présenter un capuchon de fermeture pour en protéger l'intérieur durant la migration des spermatozoïdes.

Ceci impose que cette 2ème unité de filtration soit constituée de 10 2 parties qui peuvent se séparer au dessus de la dernière membrane de filtration afin d'accéder à la chambre (12). Cette 2ème unité, comme la 1ère, présentera un nombre variable de membranes filtrantes (6) et des diamètres décroissants des pores d'une membrane à l'autre, qui restent à fixer en fonction de nos 15 observations. Toutes les combinaisons peuvent être possible; on peut d'ailleurs envisager que la 1ère unité (5) comporte des filtres dont le dernier présente des pores de 15 μ , laissant passer les spermatozoïdes, tout en filtrant la majorité des particules et que la deuxième unité soit uniquement constituée 20 d'un filtre retenant les spermatozoïdes et permettant leur lavage et leur migration dans une chambre (12). Les pores des différents filtres devraient présenter des bords les plus lisses et les plus réguliers possible afin de ne pas nuire à la structure du spermatozoïde (perforation des trous à l'aide d'un rayon laser par 25 exemple). La ou les matières qui composent le réceptacle, les ampoules, les conteneurs et les unités de filtration doivent être non toxiques et de préférence transparents, afin de pouvoir suivre les différentes étapes.

L'intérêt de ce système de filtre est de laver les spermatozoïdes, d'obtenir leur capacitation avec un minimum de manipulations et dans des conditions d'aseptie stricte. La filtration s'effectuant de façon passive, sans transfert du sperme, à l'aide de pipette, d'un tube à l'autre, ce qui diminue de façon considérable les risques éventuels de contamination septique. Une filtration active peut être réalisée en remplaçant les différentes cartouches de Earle et les conteneurs par des corps de seringues dont le piston permettra de pousser le diluant de sperme à travers le filtre.

Nous avons expérimenté cette technique de préparation sur 30 spermes de patients avec uniquement des filtres dont les pores étaient respectivement de 7 μ et 0,22 μ . Nous n'avons pas observé, par rapport à la technique classique (lavages, centrifugations et migration), de différences de mobilité des spermatozoïdes ainsi capacités. Cependant les spermes qui sont rentrés dans cette étude ne présentaient que peu ou pas de cellules ni d'éléments tapioca, en raison même de l'absence de filtre stérile à gros pores.

Un autre mode de filtration que nous avons cité dans le brevet sur 20 la fécondation en paillette, concerne des petites unités de filtration soit isolées, soit intégrées à l'extrémité de la paillette, et qui permettraient, à partir de sperme frais, de sélectionner, comme la glaire le réalise, les spermatozoïdes les plus mobiles à partir d'une petite fraction d'éjaculat frais placé 25 dans un petit conteneur. Cette petite unité de filtration pourrait être constituée de micro-filtres, ou d'une substance filtrante très visqueuse, ou même de l'association des deux. Les micro-filtres peuvent être constitués par l'enroulement d'une feuille constituée de fibres synthétiques ou non, tissées. Ce

tissage laisse des espaces entre les fibres correspondant aux mailles du filet de la glaire. Ces micro-filtres peuvent être baignés d'une substance visqueuse (collagène par exemple) renforçant le pouvoir filtrant. A l'une des extrémités on peut 5 adjoindre un petit conteneur pour une petite fraction de sperme frais, l'autre extrémité est en contact avec du milieu de culture ou avec la chambre de culture des ovocytes dans le cas de la fécondation en paillettes par exemple. Ce mode de préparation du sperme par filtration peut aussi être envisagé chez l'animal. Les 10 réceptacles, la taille des ampoules et des conteneurs variant en fonction de l'espèce.

Ces différents éléments devront être présentés en emballage stérile. Un kit pour fécondation in vitro peut ainsi être envisagé pour l'étape biologique regroupant les conteneurs de 15 fécondation et le système de préparation du sperme que nous venons de décrire.

REVENDICATIONS

1) Dispositif permettant la préparation et la sélection des spermatozoïdes humains et animaux ainsi que leur capacitation par filtration en vue d'une fécondation in vitro, ou plus généralement d'une insémination, se composant d'un réceptacle (1) pour prélever 5 le sperme, d'ampoules ou flacons (3) (10), de milieux de cultures pour la dilution et le lavage des spermatozoïdes et d'un système de filtres (5) (8) pour isoler les spermatozoïdes du reste de l'éjaculat, caractérisé en ce que le matériau qui constitue les éléments est non toxique pour les spermatozoïdes et transparent 10 afin de pouvoir suivre le déroulement de la technique, ou constitué de micro-filtres associés ou non à une substance visqueuse renforçant le pouvoir filtrant lorsqu'il s'agit de petites unités de filtration que l'on peut raccorder au dispositif de fécondation des ovocytes, notamment dans le cas d'une 15 fécondation en paillette ou qui s'y trouve déjà intégré.

2) Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce que le réceptacle (1) pour le prélèvement du sperme, de forme classique, présente un fond percé de trous (2), jouant le rôle de préfiltre, afin d'arrêter les éventuelles concrétions protéiques et un 20 système de pas de vis ou d'embout conique (4) par exemple, qui permet l'adaptation d'une ampoule ou cartouche (3) conditionnée stérilement, contenant le milieu de culture afin de diluer le sperme dès sa liquéfaction.

3) Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce que le 25 système de filtration comporte plusieurs filtres associés en une ou plusieurs unités de filtration (5) (8), la première (5) constituée de membranes filtrantes ou de filtres (6) à larges

surfaces, avec des pores dont le diamètre est décroissant d'un filtre ou d'une membrane à l'autre et qui permet de retenir les éléments les plus volumineux; la deuxième unité (8) d'un nombre variable de filtres aura pour rôle de retenir

5 éléments plus petits et d'isoler les spermatozoïdes du ci

4) Dispositif selon les revendications 1 et 3 caractérisé en ce que le dernier filtre du système présente des pores de très faible diamètre, inférieur à celui des spermatozoïdes afin de les arrêter et est surmonté d'une chambre (12) qui permet leur migration dans 10 du E2, retenu dans le filtre par un bouchon (11), la chambre devant être accessible pour le prélèvement des spermatozoïdes ainsi sélectionnés soit en séparant le filtre de l'unité de filtration, soit en passant par l'extrémité supérieure ou se fixe le conteneur (7) si l'unité n'est constituée que de ce filtre.

15 5) Dispositif selon les revendications 1 et 3 caractérisé par des conteneurs (7) (9) qui peuvent se fixer aux extrémités des unités filtrantes et recevoir les diluats, et par une ou plusieurs ampoules ou flacons de milieu de culture (10) supplémentaires à celle du départ (3) qui permet de parfaire le lavage des 20 spermatozoïdes.

6) Dispositif selon les revendications 1 et 3 caractérisé en ce que les filtres utilisés présentent des pores dont les bords doivent être les plus lisses et réguliers possibles, afin d'éviter toute atteinte de la structure du spermatozoïde lors de son 25 passage et être constitué, surtout pour le dernier filtre, d'une membrane filtrante suffisamment résistante pour permettre une filtration dans les deux sens.

7) Dispositif selon l'ensemble des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il est présenté en emballage stérile.

8) Utilisation du dispositif selon les revendications prises dans leur ensemble pour la préparation, la sélection et la capacitation 5 stériles des spermatozoïdes humains ou animaux par filtration, en vue d'une fécondation in vitro ou de l'insémination de ceux-ci dans une cavité naturelle.

- 1/1

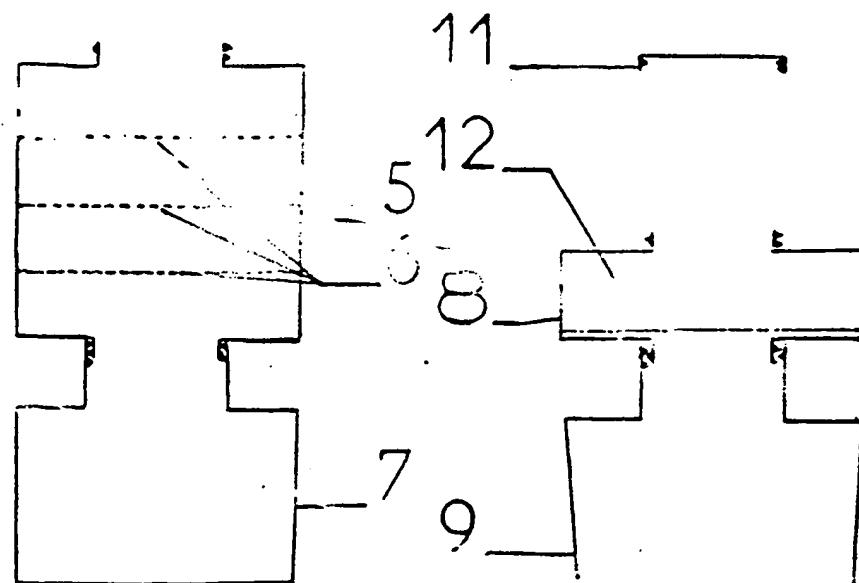
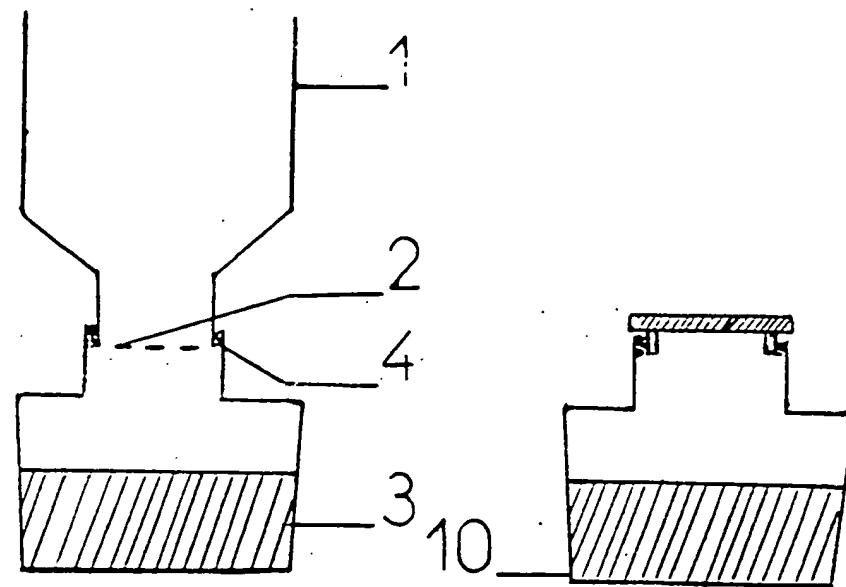


FIG.1

THIS PAGE BLANK (USPTO)